نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۶۴-۵۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 53-64
ISSN: 2008 - 4730

اثر نیتریک اکساید و آربوسکولار میکوریزا بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه شیرین‌بیان تحت تنش شوری

آرزو صفرزاده[۱] - گیتی برزین[۲]* - داریوش طالعی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

قارچ آربوسکولار میکوریزا به عنوان یک کود زیستی در تأمین نیاز غذایی گیاهان و کاهش اثرات تنش‌های محیطی بر گیاهان می‌تواند مفید باشد. از طرف دیگر، نیتریک اکساید در بسیاری از تنش‌های محیطی و غیر محیطی از جمله تنش خشکی و شوری نقش دارد. این پژوهش به منظور بررسی اثر نیتریک اکساید (در دو سطح صفر و ۰/۲ میلی‌مولار) در همزیستی قارچ آربوسکولار میکوریزا بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه شیرین‌بیان تحت سطوح مختلف تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) در شرایط گلدانی، به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش شوری، مایکوریزا و نیتریک اکساید بر میزان فلاونوئید، محتوی پرولین، میزان مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. شوری باعث افزایش میزان مالون دی آلدئید، محتوی پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) شده است. همزیستی قارچ مایکوریزا در ترکیب با نیتریک اکساید و یا به تنهایی، باعث کاهش میزان فلاونوئید و افزایش محتوی پرولین در هر سطوح از تنش شوری شد. نیتریک اکساید اثر معنی‌دار قابل توجهی بر صفات اندازه‌گیری شده نداشت ولی در ترکیب با قارچ مایکوریزا مؤثرتر واقع شد. به طور کلی، تنش شوری کلرید سدیمی بر صفات فیزیولوژیکی گیاه شیرین‌بیان اثرات منفی معنی داری داشت($p\leq ۰/۰۵$)، ولی کاربرد نیتریک اکساید به همراه قارچ مایکوریزا آربوسکولار بطور معنی داری اثرات منفی ناشی از تنش را تعدیل کرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون، پرولین، فلاونوئید، کود زیستی

مقدمه

اهمیت گیاهان دارویی سبب شده است که هر ساله تعداد بیشتری از کشاورزان با تغییر نوع کشت از زراعت‌های معمول به کشت گیاهان دارویی، به سمت تولید این دسته از گیاهان روی آورند. شیرین‌بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. گیاهی علفی چند ساله از تیره فاباسه[۴] است، گلیسریزا گلابرا یک نام یونانی بوده و از دو واژه گلیکیس به معنی شیرین و ریزا به معنی ریشه مشتق شده است و این گونه بیشترین پراکنش را در سطح ایران داشته و یکی از اقلام صادراتی کشور می‌باشد (۱، ۳۱ و ۴۵). ریشه و ریزوم شیرین‌بیان که مصارف دارویی دارند دارای ترکیبات متعددی نظیر قندهای مختلف (تا ۱۸ درصد)، فلاونوئیدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، صمغ و نشاسته، اسانس‌های روغنی و ساپونین‌ها می‌باشد. عمده‌ترین ساپونین آن اسید گلیسریزیک یا گلیسریزین به فرمول $C_{42}H_{62}O_{16}$ می‌باشد (۱۵و ۲۷).

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که باعث کاهش رشد، توسعه و تولید گیاهان در سراسر دنیا می‌شود (۳ و ۴۸). آثار ناشی از تنش شوری بر گیاهان شامل سمیت یونی، تنش اسمزی، کمبود عناصر معدنی، اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و ترکیباتی از این تنش‌ها است (۴۶ و۴۷). تنش شوری بسیاری از جنبه‌های متابولیسم گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد که در پاسخ به تنش شوری، گیاهان ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی خود را تغییر می‌دهند. پاسخ به تنش شوری بستگی به نوع گیاه، مرحلهٔ رشد و توسعهٔ گیاهی

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: Gitibarzin@iiau.ac.ir)
۳- استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهران
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i1.68893
4- *Fabaceae*

همچنین غلظت و ترکیب نمک دارد. شوری آثار منفی بر رشد گیاهان از طریق کاهش پتانسیل آب و کاهش جذب آن توسط ریشه یا از طریق برهم خوردن تعادل یونی دارد. مکانیسم‌های جذب و انباشتن یون در اندام‌های مختلف گیاه، فاکتوری بسیار مهم در تعیین تحمل به شوری گیاه عنوان شده است (۲).

کودهای زیستی شامل انواع مختلف ریزموجودات آزادزی بوده که توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیرقابل دسترس به فرم قابل دسترس طی فرآیندهای بیولوژیکی داشته و منجر به توسعه سیستم ریشه‌ای و افزایش تحمل به شرایط تنش‌زا می‌گردند (۳۸ و۵۱). قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا نیز از کودهای زیستی هستند که جزء اصلی فلور محیط ریشه گیاهان در بوم نظام‌های طبیعی می‌باشند و رابطه همزیستی با بیشتر نهاندانگان از جمله چندین گونه گیاه دارویی دارند. گیاهان از این رابطه همزیستی، با بدست آوردن مواد غذایی و بهبود کیفیت خاک سود برده و در نهایت افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی در آنها القاء می‌شود (۴۲). مایکوریزا به معنی هم‌زیستی سازنده بین یک قارچ و ریشه‌های یک گیاه است. این قارچ‌ها نقش عمده‌ای در ریزوسفر دارند، زیرا به عنوان پیوندی مهم در تبادل مواد مغذی بین گیاه و خاک عمل می‌کنند. در همین راستا کاپور و همکاران (۲۶) نشان دادند که تلقیح بذر رازیانه[1] با قارچ میکوریزا، به دلیل افزایش باروری فسفر در خاک باعث افزایش معنی‌دار رشد و همچنین بهبود عملکرد اسانس این گیاه گردید.

نیتریک اکساید[2] مولکولی فعال است که به سرعت به داخل غشا نفوذ می‌کند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که نیتریک اکساید، مولکول سیگنالی مهمی است که درگیر در فرآیندهای گوناگونی از رشد تا القاء مرگ سلول، بیان ژن و اثر متقابل با گونه‌های فعال اکسیژن[3] است و در زمان دفاع علیه پاتوژن‌ها شرکت دارد (۳۷). نیتریک اکساید به راحتی با آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن واکنش می‌دهد و باعث می‌شود تا مسیر سیگنالی متوقف شود (۳۶). نیتریک اکساید در بسیاری از تنش‌های محیطی و غیر محیطی از جمله تنش خشکی، شوری، سرما، گرما، فلزات سنگین، اشعه فرابنفش و حمله پاتوژن‌ها نقش دارد (۴۱). بر اساس شواهد زیاد، نیتریک اکساید تنظیم کننده مؤثر در رشد، نمو و دفاع گیاهان در برابر تنش‌های مختلف می‌باشد (۵۳). نیتریک اکساید تولید شده در گیاهان در غلظت‌های کم ممکن است سریعاً رادیکال‌های پراکسید را حذف و نیز گونه‌ها و اجزاء ROS را تغییر داده و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را القا نموده و از این طریق می‌تواند گیاهان را از تنش غیر زیستی محافظت نماید (۱۴). تولید نیتریک اکساید دو مرحله‌ای است و تقریباً از نظر زمانی مشابه انواع اکسیژن فعال تولید می‌شود. اگرچه نیتریک اکساید به شدت با اکسیژن واکنش می‌دهد و نیمه عمر چند دقیقه‌ای دارد اما توانایی انتشار در طول غشاءها را نیز دارد (۷).

شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان محسوب می‌شود، قارچ میکوریزا به عنوان یک کود زیستی در تأمین نیاز غذایی گیاهان و کاهش اثرات تنش‌های محیطی بر گیاهان می‌تواند مفید باشد. از طرف دیگر اثرات مثبت نیتریک اکساید در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری گزارش شده است. لذا با توجه به اهمیت گیاه دارویی شیرین‌بیان، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر تعدیل کنندگی نیتریک اکساید در همزیستی با قارچ آربوسکولار میکوریزا بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه شیرین‌بیان تحت تنش شوری کلرید سدیمی، اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل تنش شوری با NaCl (ساخت شرکت مرک با خلوص ۹۵ درصد) با پنج سطح (صفر به عنوان شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار)، نیتریک اکساید با دو سطح (صفر و ۰/۲ میلی‌مولار) و قارچ میکوریزا با دو سطح (وجود و عدم وجود میکوریزا) بودند.

برای انجام این آزمایش، مقدار ده کیلوگرم مخلوط پوکه و پومیس (با نسبت یک به یک) در داخل ۶۰ گلدان پلاستیکی (۳۰×۲۰ سانتی متر) با حجم ده لیتری و استریل شده با الکل ریخته شد. بذور جوانه زده در داخل پتری دیش‌ها بعد از رشد کافی (همگی بذور در شرایط کاملاً یکسان جوانه‌زنی و رشد کردند) به داخل گلدان‌ها انتقال یافتند. به منظور تلقیح گیاهان تیمار با قارچ، بعد از جوانه زدن و رسیدن ریشه گیاهان به اندازه دو تا سه سانتی‌متر، در موقع کشت ریشه گیاهان در معرض قارچ آربسکولار میکوریزا (*Glomus mossease*) قرار گرفتند تا بتواند از این طریق بیشترین نفوذ را به درون ریشه داشته باشد. در هر گلدان تعداد پنج گیاهچه کشت و تا مرحله دو برگی با آب مقطر آبیاری شدند و بعد از این مرحله تیماردهی با محلول غذایی هوگلند صورت گرفت. اعمال تیمارهای شوری و نیتریک اکساید (از ماده سدیم نیترو پروسید به عنوان منبع نیتریک اکساید استفاده شد) به مدت ۴۵ روز صورت گرفت. در نهایت بعد از گذشت ۶۰ روز بعد از کشت گلدانی، نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی از برگ‌های میانی هر گلدان صورت گرفت و بعد از قرار گرفتن در داخل فویل آلومینیومی با فلاکس حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

1- *Foeniculum vulgar*e
2- NO
3- ROS

سنجش فلاونوئید

برای سنجش فلاونوئیدهای برگی از روش ساوین (۵۲) استفاده شد. قطعات برگی (۰/۱ گرم) در حجم مشخصی از متانول خالص (۵ میلی‌لیتر) در دمای آزمایشگاه همگن گردیدند. بعد از سانتریفیوژ کلروفیل‌ها با استفاده از اتر نفت سبک با جداسازی فاز از محلول با کمک دکانتور حذف گردیدند. در فاز متانولی پس از ۲ بار رقیق‌سازی، طیف جذبی در ناحیه ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر تعیین و حداکثر جذب در ۲۴۰ نانومتر مشخص شد.

محتوی پرولین آزاد

برای اندازه‌گیری محتوی پرولین از روش بیتس و همکاران (۶) استفاده شد. برای این کار ابتدا سپس ۰/۵ گرم از قسمت پهنک برگ نمونه‌ها در هاون چینی بوسیله ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک خوب خرد شدند. از مخلوط همگن حاصل پس از صاف کردن توسط دستگاه سانتریفیوژ، ۲ میلی‌لیتر برداشته و در داخل لوله‌های آزمایش در پوش‌دار ریخته شد، و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر معرف اسید نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. بعد از سرد شدن نمونه‌ها در زیر هود، به هر نمونه مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه کرده و خوب تکان داده شد تا کاملاً مخلوط شوند. در نهایت میزان جذب یک میلی‌لیتر از فاز بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد، میزان پرولین برگ بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم برگ محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید

برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید از روش اوکاو و همکاران (۴۰) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت گیاهی، به قطعات کوچک تقسیم و با هموژنایزر در ۲ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۵ درصد در مجاورت یخ هموژن شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول روئی برداشته شد. نیم میلی‌لیتر از این محلول با نیم میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری کلرواستیک ۲۰ درصد مخلوط و در ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه انکوبه شد. سپس در شرایط سرد در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت جذب محلول روئی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری کلرواستیک ۲۰ درصد به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار مالون دی آلدئید با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش پریرا و همکاران (۴۴) با بررسی میزان کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر سنجیده شد. مخلوط مورد استفاده شامل بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار و pH=۷/۵) و پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد (حجمی/حجمی) بود. ۲/۵ میلی لیتر بافر تریس و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن در حمام یخ با هم مخلوط شده و سپس ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. بلافاصله عدد جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن برگ تر محاسبه شد (برای صفر شدن دستگاه از ترکیب ۲/۵ میلی لیتر بافر تریس و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، بدون افزودن هیچ عصاره‌ای استفاده شد).

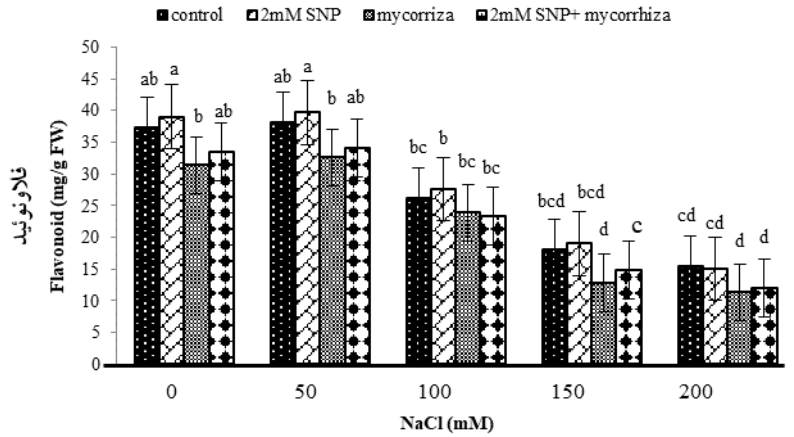
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش کوری (۲۸) سنجیده شد. مخلوط مورد استفاده شامل بافر استات (۰/۲ میلی‌مولار و pH=۴/۸)، پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد (حجمی/حجمی) و بنزیدین ۰/۰۴ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد می‌باشد. ۲ میلی لیتر بافر استات و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بنزیدین و ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن را در حمام یخ مخلوط کرده و بلافاصله پس از اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن، عدد جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن برگ تر محاسبه شد (برای صفر شدن دستگاه از ترکیب ۲ میلی لیتر بافر استات و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بنزیدین و ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، بدون افزودن هیچ عصاره‌ای استفاده شد).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش گیانپولیتیس و رییس (۲۱) انجام شد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که به ۵۰ درصد مهار احیای نیتروبلو تترازولیوم[1] در ۵۶۰ نانومتر منجر می‌گردد و به نسبت میلی‌گرم پروتئین عصاره گیاهی بیان می‌شود. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقداری مایع رویی با بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار و pH=۷/۵ حاوی ۳ میلی مولار EDTA، ۲۰۰ میلی‌مولار متیونین، ۲/۲۵ میلی‌مولار نیتروبلوتترازولیوم کلراید، ۱/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم و آب مقطر مخلوط گردید. در تاریکی به نمونه‌ها ریبوفلاوین ۶۰ میکرومولار اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور سفید قرار گرفتند.

1- NBT



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر میزان فلاونوئید برگ شیرین‌بیان

Figure 1- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf flavonoid content of *Glycyrrhiza glabra* L.

(Duncan's multiple range test, $p\leq0.05$)

در نهایت میزان جذب در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و یک واحد فعالیت آنزیمی به صورتی تعریف شد که بتواند از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید ۵۰ درصد جلوگیری کند.

تحلیل و تجزیه آماری

داده‌های حاصل از تحقیق در برنامه نرم‌افزاری SPSS 22 (IBM SPSS Statistics 22.0) وارد شدند. نرمال بودن داده‌ها بررسی و آمار استنباطی از قبیل تجزیه واریانس[1] و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن محاسبه شد.

نتایج

میزان فلاونوئید برگ

نتایج به دست آمده نشان داد که اثرات اصلی و اثر متقابل شوری، نیتریک اکساید و مایکوریزا بر میزان فلاونوئید برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان فلاونوئید برگ در سطح شوری صفر (۳۳/۰۹ mg/gFW) و سطح ۵۰ میلی‌مولار (۳۹/۷۳ mg/gFW) در شرایط کاربرد نیتریک اکساید مشاهده شد و کمترین میانگین این صفت در بالاترین سطح تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) در شرایط استفاده از مایکوریزا و تلفیق مایکوریزا + نیتریک اکساید بدست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۶۹/۷۵، ۶۷/۶۴ درصد کاهش نشان دادند (نمودار ۱).

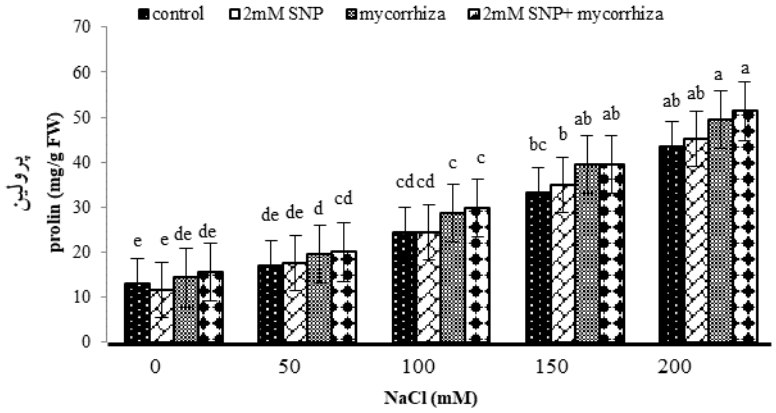
محتوی پرولین برگ

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و اثر متقابل شوری، نیتریک اکساید و مایکوریزا بر میزان پرولین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و بیشترین محتوی پرولین آزاد در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در شرایط استفاده از مایکوریزا به تنهایی و در ترکیب با نیتریک اکساید به ترتیب با میانگین ۴۹/۵۳ و ۵۱/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بود که در مقایسه با تیمار شاهد بیش از چهار برابر افزایش محتوی پرولین را نشان داد. کمترین محتوی پرولین نیز در تیمار شاهد با میانگین ۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ حاصل شد (نمودار ۲).

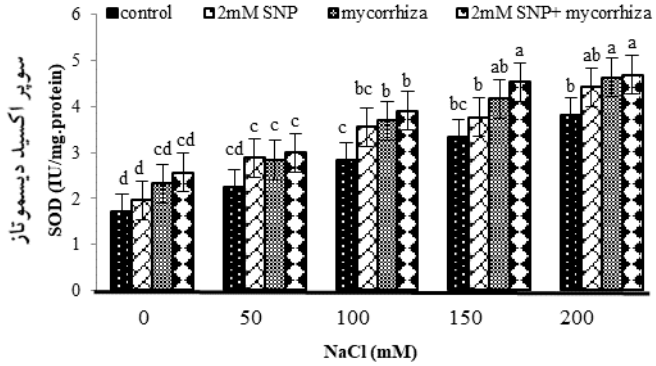
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

سوپر اکسید دیسموتاز از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی است که در پاسخ به تنش در گیاه تولید می‌شود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش تنش شوری باعث افزایش میزان فعالیت این آنزیم گردید، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در بالاترین سطح تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) در شرایط کاربرد مایکوریزا به تنهایی یا در ترکیب با نیتریک اکساید حاصل شد که در مقایسه با تیمار شاهد، افزایش فعالیت حدود ۳ برابری را نشان می‌دهد. کمترین فعالیت این آنزیم نیز در تیمار شاهد و همچنین شوری صفر میلی-مولار در شرایط استفاده از نیتریک اکساید حاصل شد (نمودار ۳).

1- ANOVA



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر روی میزان پرولین برگ شیرین‌بیان
Figure 2- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf free proline content of *Glycyrrhiza glabra* L.
(Duncan's multiple range test, $p\leq0.05$).



نمودار ۳- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر روی میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز برگ شیرین‌بیان
Figure 3- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf SOD activity of *Glycyrrhiza glabra* L.(Duncan's multiple range test, $p\leq0.05$).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

اثر تنش شوری، مایکوریزا و نیتریک اکساید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و اعمال تنش شوری باعث افزایش فعالیت این آنزیم شد، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس نتایج به دست آمده در سطوح شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در شرایط استفاده از تلفیق نیتریک اکساید + مایکوریزا بدست آمد که در مقایسه تیمار شاهد افزایش فعالیت حدود ۲/۵ برابری را نشان دادند. کمترین فعالیت این آنزیم نیز در تیمار شاهد بدست آمد (نمودار ۴).

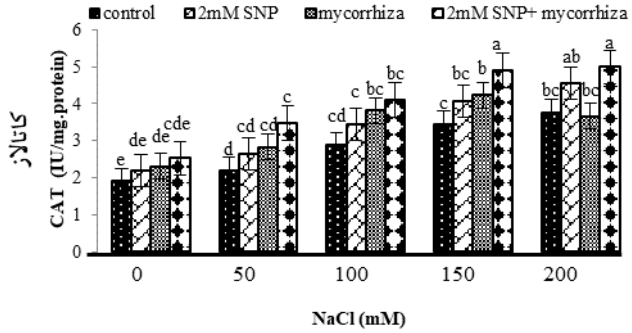
فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

الگوی افزایش فعالیت آنزیمی با افزایش سطوح تنش شوری، در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز صادق بود، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در بالاترین سطح تنش شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) در شرایط استفاده از مایکوریزا به تنهایی یا در ترکیب با نیتریک اکساید بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش فعالیت بیشتر از ۳ برابری را نشان دادند. کمترین فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد در سطوح شوری صفر و ۵۰ میلی‌مولار بدست آمد (نمودار ۵).

میزان مالون دی آلدئید

میزان مالون دی آلدئید یکی از شاخص‌های مهم برای تعیین میزان تنش وارد شده به گیاه است. نتایج حاصل نشان داد که اثر متقابل شوری، نیتریک اکساید و مایکوریزا بر میزان مالون دی آلدئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و بیشترین میانگین مالون دی آلدئید در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در شرایط عدم استفاده و استفاده از مایکوریزا بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش میانگین

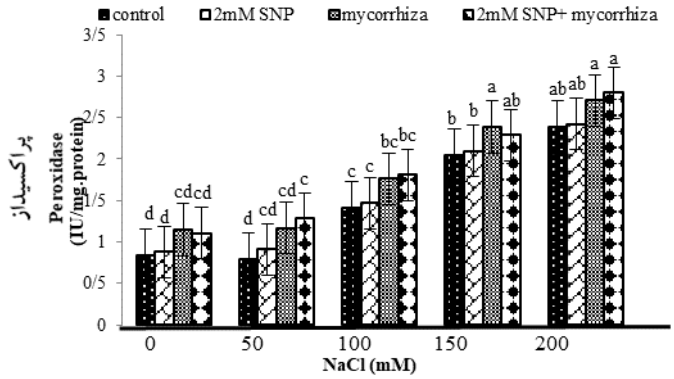
حدود ۳/۵ برابری را نشان دادند. کمترین فعالیت هم در سطح شوری صفر میلی‌مولار در شرایط استفاده از نیتریک اکسید حاصل شد (نمودار ۶).



نمودار ٤- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ شیرین‌بیان

Figure 4- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf CAT activity of *Glycyrrhiza glabra* L.

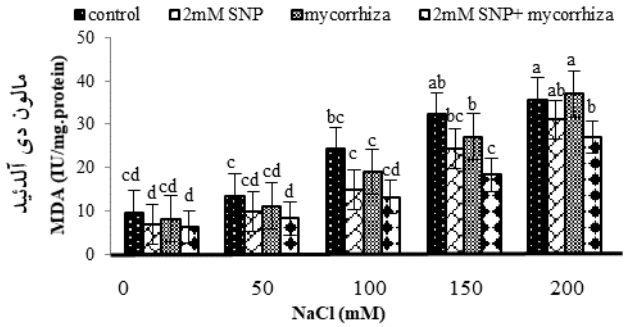
(Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$).



نمودار ٥- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر روی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ شیرین‌بیان

Figure 5- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf POD activity of *Glycyrrhiza glabra* L.

(Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$).



نمودار ٦- اثر غلظت‌های مختلف تنش شوری، میکوریزا و نیتریک اکساید بر روی میزان مالون دی آلدئید برگ شیرین‌بیان

Figure 6- Effect of different concentrations of salinity stress, mycorrhiza and nitric oxide on leaf MDA of *Glycyrrhiza glabra* L.

(Duncan's multiple range test, $p \leq 0.05$).

بحث

تنش شوری نظیر دیگر تنش‌های محیطی می‌تواند سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه شده و نوعی تنش اکسیداسیونی را به دنبال داشته باشد که سبب آسیب رساندن به ساختارهای غشایی، پروتئین‌ها، اسید نوکلئیک و غیره می‌شود (۱۶). گیاهان از نظر توانایی مقاومت در برابر این چنین اختلالات متابولیسمی با درجات مختلف به تنش‌ها پاسخ می‌دهند. سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهان که آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و مولکول‌های غیر آنزیمی نظیر رنگیزه‌های گیاهی و غیره را شامل می‌شوند، بخشی از توانایی گیاهان در تحمل به تنش شوری به شمار می‌آیند (۲۳) و گیاهانی که سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی کارآمدتری داشته باشند، بهتر می‌توانند در برابر تنش‌های محیطی نظیر شوری مقاومت کنند (۳۹ و ۵۷). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنش شوری کلرید سدیمی موجب افزایش محتوی پرولین، میزان مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گردید ولی برعکس موجب کاهش میزان فلاونوئیدهای گیاه شیرین‌بیان شد. این میزان افزایش در سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با تیمار شاهد در مورد پرولین و مالون دی آلدهید بیش از ۴ برابر، در مورد سوپر اکسید دیسموتاز بیش از ۳ برابر، در مورد کاتالاز بیش از ۲ برابر و در مورد پراکسیداز بیش از ۲/۵ برابر بود (اشکال ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶).

نیتریک اکساید (NO) به عنوان تنظیم کننده در متابولیسم گونه-های فعال اکسیژن عمل می‌کند (۴۹). سدیم نیتروپروساید یکی از تولید کننده‌های مهم NO است که به ازای هر ۰/۵ میلی‌مول بر لیتر قادر به تولید حدود ۲ میکرومول بر لیتر رادیکال NO می‌باشد (۱۱و ۲۲). در پژوهشی کاربرد نیتریک اکساید در غلظت‌های مختلف باعث کاهش رشد و میزان پروتئین در گیاهچه‌های بادرنجبویه گردید ولی میزان ترکیبات فلاونوئیدی این گیاه تحت تأثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان ترکیبات فلاونوئیدی به میزان ۲/۵ برابر نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (۲۰). در پژوهش دیگری که بر روی *Echinacea purpurea* صورت گرفته، مشخص شد تیمار گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و مشتقات اسید کافیک را افزایش داد (۵۵).

قارچ‌های آربوسکولار مایکوریزا متعلق به شاخه Glomeromycota هستند که همزیستی متقابل با اکثریت گیاهان پیشرفته برقرار می‌کنند و موجب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی، بدست آوردن مواد غذایی و بهبود کیفیت خاک می‌گردد (۲۴). همچنین در بررسی‌های قبلی به تأثیر قارچ‌های آربوسکولار مایکوریزا بر تولید ترکیبات فنولیک در ریشه‌ها (۳۰) و افزایش تولید ترکیبات فنولیک (رزمارینیک اسید و کافئیک اسید) در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاه ریحان کلونیزه شده با قارچ‌های آربسکولار اشاره شده است (۵۴).

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) یکی از آنزیم‌های اصلی و از اولین آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها است. در مورد نقش سدیم نیتروپروساید بر فعالیت آنزیم PAL نتایج متعدد و متناقضی وجود دارد. برای نمونه، دوان و همکاران (۱۹) گزارش کردند که تیمار سدیم نیتروپروساید باعث کاهش فعالیت آنزیم PAL در میوه لونگان شده است که با تا حد زیادی با نتایج ما همخوانی دارد. اما از طرف دیگر در گیاه گوجه‌فرنگی تنش خشکی و تیمار سدیم نیتروپروساید فعالیت آنزیم PAL را افزایش داد (۳۵).

یکی از ساز و کارهای مهم گیاهان عالی تحت تیمار تنش شوری انباشت ترکیبات سازگار مانند پرولین است که به عنوان یک ماده محافظت کننده غیر سمی، برای تنظیم اسمزی در شرایط شوری و سایر تنش‌های محیطی مطرح است (۵). تجمع پرولین در گیاهان، باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل می‌شود، بنابراین به نظر می رسد تجمع پرولین به عنوان سازوکاری مؤثر جهت کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و حفظ محتوای آب یاخته‌ای گیاه، تحت شرایط شوری مطرح باشد. افزایش پرولین در برگ‌های دو رقم توت همراه با افزایش شوری گزارش شده است (۲۹)، همین‌طور در این پژوهش با افزایش غلظت نمک فارغ از نیتریک اکساید و میکوریزا، میزان پرولین در گیاه شیرین‌بیان هم افزایش یافته است که با نتایج ارائه شده همخوانی دارد. پرولین دارای اثر مستقیم در ثبات بخشیدن به ماکرومولکول‌ها و لایه‌های هیدراسیون آنها بوده و همچنین به علت خواص آنتی اکسیدانی خود یک عمل حفاظتی غیر مستقیم نیز بروز می‌دهد. نقش آنتی اکسیدانی پرولین، در توانایی آن برای غیرفعال کردن رادیکال-های هیدروکسیل و سایر ترکیبات دارای فعالیت بالا که تحت شرایط تنش تولید شده و در انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها اختلال ایجاد می‌کنند، تظاهر می‌یابد و از این طریق پروتئین‌ها و غشاها را در برابر آسیب محافظت می‌نماید (۱۰). افزایش تجمع پرولین در شرایط شوری را می‌توان به کاهش میزان پرولین اکسیداز نسبت داد که باعث تجزیه پرولین می‌گردد همچنین افزایش در میزان ۵-کربوکسیلات سنتتاز که سنتز پرولین را افزایش می‌دهد، می‌تواند از دیگر دلایل افزایش میزان پرولین در شرایط تنش شوری باشد (۳۴). وو و همکاران (۵۶) گزارش داده‌اند که کاربرد نیتریک اکسید در شرایط تنش شوری باعث افزایش میزان پرولین در گوجه‌فرنگی شده

است که با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. بنابراین کاربرد نیتریک اکسید در شرایط تنش شوری می‌تواند باعث بهبود رشد گیاه شده و در نتیجه مقاومت به تنش شوری را افزایش دهد.

در بررسی‌های صورت گرفته فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز طی تنش شوری افزایش معنی‌داری می‌یابد و آسکوربات از طریق کاهش ROS سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های نامبرده می‌شود (۴۳) که هم راستا با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. اعمال تیمار شوری در پژوهش حاضر، موجب افزایش فعالیت هر سه آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز شده است. مشخص شده است که آنزیم‌های آنتی اکسیدان با از بین بردن انواع فعال اکسیژن، مقاومت گیاه را به شوری افزایش می‌دهد. در پژوهشی اثرات متقابل شوری و تیمار مایکوریزا بر میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز معنی‌دار بود و با افزایش درجه شوری، فعالیت این دو آنزیم در گیاهان مایکوریزایی و غیر مایکوریزایی افزایش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۵۷).

کاتالاز اصلی‌ترین آنزیم از بین برنده پراکسید هیدروژن و از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان محسوب می‌شود و تنش شوری در بسیاری از گیاهان موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردیده است که این نتیجه در تحقیق حاضر در ارتباط با فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده گردید (۲۳).

سوپر اکسید دیسموتاز جزء متالوآنزیم‌هایی است که سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌ها، در پاسخ به شرایط مختلف محیطی و تنش‌های غیر زیستی مانند شوری و خشکی افزایش پیدا می‌کند (۱۳). آنیون-های سوپر اکسید به وسیله تنش شوری در سلول تولید می‌شود، زیرا مهم‌ترین تأثیر تنش شوری بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن است که در نتیجه آن رشد کاهش می‌یابد. همچنین افزایش تنفس در این شرایط سبب تولید این یون‌های مخرب در میتوکندری سلول می‌شود. در چنین شرایطی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان یک آنزیم از بین برنده یون سوپر اکسید، مشابه نتایج به‌دست آمده افزایش می‌یابد. با افزایش فعالیت این آنزیم سمیت‌زدایی یون سوپراکسید افزایش و آسیب‌های حاصل از آن در گیاه کاهش می‌یابد (۲۵و ۵۸). به عبارت دیگر، در هنگام تنش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با بازده بسیار بالا با رادیکال‌های آنیون سوپر اکسید واکنش داده، آب و اکسیژن تولید می‌کند، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم تحت تیمار NaCl می‌تواند یک پاسخ رایج برای مقابله با اثرات مخرب تنش شوری باشد. پیشنهاد شده که نیتریک اکساید به وسیله تحت تأثیر قرار دادن سنتز پروتئین آنزیم، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (۳۱). نقش نیتریک اکساید در کاهش تنش اکسیداتیو ممکن است بخشی به توانایی نیتریک اکساید در القاء آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باشد. نیتریک اکساید با تسریع تبدیل آنیون و سوپراکسید به پراکسید هیدروژن آن را از سمیت خارج می‌کند (۱۳ و ۴۹).

پراکسیداز پروتئین دارای هم است که از H_2O_2 برای اکسیداسیون مواد آلی و غیر آلی استفاده می‌کند. این آنزیم عمدتاً در دیواره سلولی قرار داشته و دارای نقش‌های مختلفی از جمله جاروب کردن H_2O_2 می‌باشد (۳۳). تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز به ترتیب در برگ کلزا و پنبه شده و در نتیجه اثرات مخرب تنش شوری را در این گیاهان کاهش داده است (۵). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش شوری در گیاه پونه و گزارش‌های مذکور در تنش‌های دیگر می‌تواند نقش حفاظتی این آنزیم را در مقابل تنش‌های مختلف پیشنهاد کند. همچنین با توجه به نقش مهم آنزیم پراکسیداز در حذف آنزیمی H_2O_2، کاهش مالون دی آلدهید و حفظ یکپارچگی غشای سلول، افزایش این آنزیم در گیاهان تحت تنش شوری کاملاً منطقی به نظر می‌رسد (۶۰). آنزیم پراکسیداز با استفاده از مواد فنولیک به عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (۴). از آنجایی که تجمع پراکسید هیدروژن ناشی از واکنش سوپراکسید دیسموتاز نیاز به فعالیت ترکیبی دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به منظور حفاظت سلول‌های گیاهی خواهد داشت، لذا این دو آنزیم نقش مهمی را در حذف پراکسید هیدروژن ایفاء می-نمایند. شواهد زیادی مبنی بر افزایش و کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش وجود دارد و اگرچه افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز توسط تنش شوری در گیاهان مختلف گزارش شده است (۱۸). به نظر می‌رسد که در اثر تنش شوری تولید پروتئین‌های تیلاکوئید کاهش ولی پروتئین‌های دخیل سنتز برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش نشان می‌دهد (۸).

مالون دی آلدئید یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است (۵۰). تغییر در پراکسیداسیون لیپیدها به عنوان یک شاخص مهم جهت تعیین میزان خسارت اکسیداتیو در موجودات زنده محسوب می‌شود و منجر به کاهش یکپارچگی غشاء در موجودات زنده تحت شرایط تنش می‌گردد (۱۷). به نظر می‌رسد دلیل اصلی خسارت شدید به غشای سلولی در اثر تنش شوری، تولید رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل باشد که در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی می‌گردد (۱۷). پژوهشگران دلیل اصلی خسارت شدید به غشای سلولی را تولید رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌دانند که در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی می‌گردد (۹). در ارتباط با گیاه شیرین‌بیان و پژوهش حاضر، با اعمال تنش شوری میزان موانولات دی الدهید که شاخصی برای واکنش‌های گیاه نسبت به تنش‌ها می‌باشد، افزایش یافته است که با نتایج ارائه شده مطابقت دارد. گزارشی مبنی بر نقش کاهش

دهندگی نیتریک اکساید در پراکسیداسیون چربی‌ها وجود دارد (۵۰). چنانچه در بالا ذکر شد، مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون چربی‌ها است و برای ارزیابی پراکسیداسیون چربی‌ها استفاده می‌شود (۵۹).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان گفت که حذف و سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن یک بخش مهم تحمل شوری در گیاهان می‌باشد. در پژوهش حاضر، اعمال تنش شوری میزان موانولات دی آلدهید که شاخصی برای واکنش گیاه نسبت به تنش‌ها هستند، به طور چشم‌گیری افزایش نشان داده است. همراه با تنش شوری، اعمال تنش نیتریک اکسید موجب شده تا اثرات غلظت بالا نمک در برخی شاخص‌ها کم شود، به طوری که در غلظت بالای نمک موانولات دی آلدهید با اعمال نیتریک اکسید کاهش نشان می‌دهند. اعمال تیمار شوری موجب افزایش چشمگیر فعالیت سه آنزیم آنتی اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز شد. تنها موردی که اثر تیمار میکوریزا در آن قابل توجه بود، میزان فلاونوئید بود که در آن اثر منفی غلظت بالای نمک بر روی میزان کل فلاونوئیدها، با اعمال تیمار میکوریزا، تعدیل و کم شده است. به طور کلی نتایج به دست آمده نشان داد که تنش شوری اثر کاهنده بر صفات مورد مطالعه داشت ولی کاربرد قارچ آربوسکولار مایکوریزا به همراه نیتریک اکساید باعث تعدیل اثرات منفی ناشی از تنش شوری کلرید سدیمی در گیاه شیرین بیان شد.

منابع

1- Agyare, C., Boakye, Y.D., Bekoe, E.O., Hensel, A., Dapaah, S.O., and Appiah, T. 2015. Review: African medicinal plants with wound healing properties. Journal of ethnopharmacology, 65(4): 245-255.
2- Akram, M.S., and Ashraf, M. 2009. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of potassium nitrate. Journal of Applied Botany and Food Quality, 83:19-27.
3- Amirjani, M.R. 2010. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. European Journal of Biological Sciences, 3 (1): 06-16.
4- Appel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review Plant Biology, 55: 373-399.
5- Ashraf, M., Orooj A. 2006. Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). Journal of Arid Environment, 64: 209-220.
6- Bates, L., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
7- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L., and Jones, R.L. 2002. Nitric oxideacts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. Plant Physiology, 129: 1642-1650.
8- Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. Plant Science Journal, 164: 77–84.
9- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology, 126: 1024–1030.
10- Brayant, J.P., Chapin, F.S., and Klein D.R. 1983. Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos Journal, 40: 357-368.
11- Butler, A.R., and Megson, I.L. 2002. Non-heme iron nitrosyls in biology. Chemical Review Journal, 102(4): 1155-1165.
12- Chaparzadeh, N., D'Amico, M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R., and Navari-Izzo, F. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 695-701.
13- Chaparzadeh, N., Pajang, M., and Mohammadpour, A. 2015. The role of nitric oxide precursor in antioxidant responses of chickpea when reducing the nightly temperature. Process and Plant Function, 12 (4): 9-1.
14- Chohan, M., Naughton, D.P., Jones, L., and Opara, E.I. 2012. An investigation of the relationship between the anti-inflammatory activity, polyphenolic content and antioxidant activities of cooked and in vitro digested culinary herbs. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, P: 1-9. doi:10.1155/2012/627843.
15- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., and Doerr, H.W. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. The Lancet Medical Journal, 361: 2045– 2046.
16- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences, 57: 779-795.
17- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., and Barroso, J.B. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiology, 141:

330–335.
18- Demiral, T., and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental Experiment Botany, 53: 247–257.
19- Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z., and Shi, J. 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinenesis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. Food Chemistry, 101:1365–1371.
20- Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Rezaei Nodehi, A., and Najafi, Sh. 2015. Effect of nitric oxide on growth rate and some physiological indices of leaf seedlings planting in in vitro conditions, Journal of Cell and Texture, 6 (2): 203-195. (in Persian with English abstract)
21- Giannopolitis, C.N., and Reis, S.K. 1997. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59:309-314.
22- Haihua, H., Wenbiao, S., Maobing, Y., Langlai, X. 2002. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Chinese Science Bulletin, 47: 677-681.
23- Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R., and Ruiz-Lozano, J.M. 2008. Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo Physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. Microbial Ecology, 55: 45-53.
24- Jeffries, P., and Barea, J.M. 2001. Arbuscular mycorrhiza-a key component of sustainable plant–soil ecosystems. In: Fungal associations (ed. Hock, B.) 95–113. Springer-Verlag, Berlin.
25- Jevremovic, S., Petric, M., Zivkovic, S., Trifunovic, M., and Subotic, A. 2010. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. Archives of Biological Sciences, 62: 553-558.
26- Kapoor, R., Giri, B., and Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in (*Foeniculum vulgare* mill) on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technology, 93: 307-311.
27- Khanahmadi, M.M, Naghdi Badi, H., Akhondzadeh, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Mehrafarin, A., Shahriari, S. 2013. A Review of the medicinal plant of *Glycyrrhiza glabra* L. Journal of Medicinal Plants, 2(46):1-12.
28- Koroi, S.A.A. 1989. Gel elektrophers tische and spectral photometrischoe under uchungen zomein fiuss der temperature auf straktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme. Physiological Journal, 20: 15-23.
29- Kumar, S.G., Reddy, A.M., and Sudhakar, C. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. Plant Science, 165:1245-1251.
30- Larose, G., Chenevert, R., Moutoglis, P., Gagne, S., Piche, Y., and Vierheilig, H. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* L. are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing *Arbuscular mycorrhizal* fungus. Journal of Plant Physiology, 159:1329–1339.
31- Liu, X., Wang, L., Liu, L., Guo, Y., and Ren, H. 2011. Alleviating effect of exogenous nitric oxide in cucumber seedling against chilling stress. African Journal of Biotechnology, 10: 4380-4386.
32- Lu, S., Wang, Q., Li, G., Sun, S., Guo, Y., and Kuang, H. 2015. The treatment of rheumatoid arthritis using Chinese medicinal plants: from pharmacology to potential molecular mechanisms. Journal of Ethnopharmacology, 176:177-206.
33- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P.C., and Sohrabi, Y. 2011. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpeas (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science, 10: 1255-1260.
34- Misra, N., and Saxena, P. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. Plant Science, 177: 181-188.
35- Nasibi, F., Yaghubi, M.M., and Manoochehri Kalantari. Kh. 2011. Comparison of the effect of sodium nitro process and arginine pre-treatment on some physiological responses of tomato (*Lycopersicon esculentum*) under water stress. Iran Biological Journal, 24 (6): 132-121.
36- Nayyar, H. 2003. Acclimation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat and maize as affected by calcium and its antagonists. Environmental and Experimental Botany, 50: 253-264.
37- Neill, S., Radhika, D., and Hancock, J. 2003. Nitric oxide signaling in the plant. New phytology, 159:11-35.
38- Nofal, O.A., and Rezk, A.L. 2009. Role of fertilization in improving quality of some agricultural crops. International Journal of Academic Research, 1: 59-65.
39- Nunez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siquira, W.J., and Zullo, M.A. 2003. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Plant Biology, 47: 67-70.
40- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95: 351.
41- Palavan, U.N., and Arisan, D. 2009. Nitric oxide signaling in plants. Biology Reviews, 75:203-229.
42- Panwar, J., and Tarafdar, J.C. 2006. *Arbuscular mycorrhiza* fungal dynamics under *Mitragyna parvifolia* (Roxb.)

north. In Thar Desert. Applied soil Ecology, 34: 200-208.

43- Parrida, A.K., Das, A.B., and Mittra, B. 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguier parviflora*. Trees Journal, 18:167-174.

44- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., and Lea, P.J. 2002. The activity of antioxidant enzyme in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. Plant Soil, 239: 123-132.

45- Rafiei, A.l., Husseini, M., Tadion, M., and Mazhari, M. 2014. The Effect of dormancy break treatments on seed germination of Licorice. Journal of Crop Improvements, 16 (4): 817-809. (in Persian with English abstract).

46- Rajaravindran, M., and Natarajan, S. 2012. Effects of salinity stress on growth and antioxidant enzymes of the halophyte *Sesuvium portulacastrum*. International Journal of Research in Plant Science, 2(1): 23-28.

47- Saleh, B. 2013. Water status and protein pattern change towards salt stress in Cotton. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(1): 113-123.

48- Sevengor, S., Yasar, F., Kusvuran, S., and Ellialtioglu, S. 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. African Journal of Agricultural Research, 6(21):4920- 4924.

49- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., and Wei, M. 2007. Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 542-550.

50- Singh, N.B., Kavita, Y., and Nimisha, A. 2014. Positive effects of nitric oxide on *Solanum lycopersicum*. Journal of Plant Interactions, 9: 10-18.

51- Stavros, D.V., Baodong, C., and Matthias, C.R. 2012. *Arbuscular mycorrhiza* and soil nitrogen cycling. Journal of Soil Biology and Biochemistry, 46: 53-62.

52- Swain, T., and Hillis, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. Journal of Science and Food Agriculture, 10:63-68.

53- Tian, X., and Li, Y. 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seeding. Plant Biology, 50: 775-778.

54- Toussaint, J.P, Smith, F.A., and Smith, S.E. 2007. *Arbuscular mycorrhizal* fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza, 17:291–297.

55- Wu, C.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. 2007. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpura*. Journal of Plant Biology, 50: 636–643.

56- Wu, X., Zhu, W., Zhang, H., Ding, H., and Zhang, H.J. 2011. Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Acta Physiologiae Plantarum, 33:1199-1209.

57- Younesi, A., and Moradi, A.S. 2016. Evaluation of antioxidant enzymes activity in response to mycorrhizal inoculation in wheat under salt stress. Journal of Crop Improvement, 18 (1): 30-21. (in Persian with English abstract).

58- Yu, L., Gao, R., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., and Yang, F. 2013. Exogenous application of sodium nitroprusside alleviated cadmium induced chlorosis, photosynthesis inhibition and oxidative stress in cucumber. Pakistan Journal of Botany, 45: 813-819

59- Zeng, C.L., Liu, L., Wang, B.R., Wu, X.M., and Zhou, Y. 2011. Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea* seedlings under NaCl stress. Biologia Plantarum, 55: 345-348.

60- Zhang, Y.J., Zhang, X., Chen, C.J., Zhou, M.J., and Wang, H.C. 2010. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazloe, and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98: 151–157.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.1, Spring 2019, P. 53-64
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۶۴-۵۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Effect of Nitric Oxide and Arbuscular Mycorrhiza on some Physiological Traits of Liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Plant under Salinity Stress

A. Safarzade[1] - G. Barzin[2*]- D. Talei[3]

Received: 20-12-2017
Accepted: 02-01-2019

Introduction: The salinity affliction of land constitutes a major threat amongst the various forms of soil degradation. Arbuscular mycorrhiza fungus can be useful as a bio-fertilizer in providing plant nutrition and reducing the effects of environmental stresses on plants. On the other hand, nitric oxide plays a role in many environmental and non-environmental stresses, including drought and salinity stresses. Liquorice (*Glycyrrhiza globra* Linn.), commonly known as Mulahatti and Yashtimadhu, is the highest priority value crop which can be successfully cultivated on salt-affected and degraded lands. It is a small perennial leguminous herb of the family Fabaceae (Papilionaceae) native to the Mediterranean region and central and southwest Asia, and cultivated in Italy, Russia, France, UK, USA, Germany, Spain, China, Pakistan, Afghanistan, Iran, Iraq, Uzbekistan, Turkey, Turkmenistan and north-western India. This research was carried out with the aim of investigating the effect of nitric oxide modification on coexistence with arbuscular mycorrhizal fungus on some of the physiological traits of licorice under the salt stress of sodium chloride.

Materials and Methods: This research was a factorial experiment based on completely randomized block design with three replications. Factors consisted of five levels of NaCl-salinity (0 as control, 50, 100, 150 and 200 mM), two levels of nitric oxide (0 and 0.2 mM) and two levels of mycorrhizal fungi (the presence and absence of mycorrhizal). To do this, 10 kg pot of pumice mixture and pumice (1 to 1 ratio) were poured into 60 plastic containers (30 x 20 cm; 10 L) and sterilized by alcohol. The seeds germinated in petri dishes after adequate growth, they were transferred to the pots (all seeds were germinated and grown in the same conditions). In each pot, five seedlings were cultured and irrigated with distilled water until a two-leaf stage. After that, the treatment was carried out by a Hoagland solution. Application of saline treatments and nitric oxide (from sodium nitroproced as nitric oxide source) was performed 45-days. Finally, after 60 days of planting, sampling was carried out to measure the physiological traits from the middle leaves of each pot, and after being placed in an aluminum foil with ice-containing flux, it was transferred to the laboratory and then transferred to 80 ^{o} C. The evaluated traits were leaf flavonoids by Swain (52) method, proline content by Bates et al. (6) method, MDA with Ohkawa et al. (40) method, CAT activity by Pereira et al. (44) method, POD activity by Korori (28) method and SOD activity by Giannopolitis and Reis (21) method. The data were analyzed by SPSS 22 (IBM SPSS Statistics 22.0) software application. The data was normalized and inferential statistics such as analysis of variance and mean comparison of treatments were calculated using Duncan's multiple range test.

Results and Discussion: The results showed that the salinity stress had significant effect on flavonoid content, proline content, malondialdehyde rate and antioxidant activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase. Salinity had increased levels of malondialdehyde, proline content, and the activity of antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, and superoxide dismutase). The coexistence of mycorrhiza fungus in combination with nitric oxide or alone reduced the number of flavonoids and increased proline content at each level of salinity stress. Nitric oxide had no significant effect on measured traits but was more effective in combination with Mycorrhiza fungi. In general, sodium chloride salinity stress had a negative effect on the physiological traits of liquorice, but the use of nitric oxide with arbuscular mycorrhizal fungus reduced the negative effects of stress. In general, it can be said that the removal and decontamination of active oxygen species is an important part of salinity tolerance in plants. In the present study, salinity stresses have significantly increased the amount of MDA, which is an indicator of plant response to stress. In addition to salinity stress, nitric oxide stress has been induced to reduce the effects of high salt concentration on some of the indices, thus reducing nitric oxide in high concentrations of MDA. Application of saline treatment significantly increased the activity of the three antioxidant enzymes CAT, POD, and SOD. The results showed that salinity stress had a decreasing effect on studied traits, but the application of arbuscular mycorrhizal fungus with nitric oxide reduced the negative effects of sodium chloride salinity stress on liquorice plant.

Keywords: Antioxidant enzymes, Biofertilizer, Flavonoid, Peroxidation, Proline

1and 2- B.SC Student and Associate Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Tehran
(*- Corresponding Author Email: Gitibarzin@iiau.ac.ir)
3- Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran